

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014277373

WPI Acc No: 2002-098075/*200213*

XRAM Acc No: C02-030625

**Test system for detecting particular kinase and phosphatase activities,
useful for diagnosis of e.g. cardiovascular disease and in screening for
specific modulators**

Patent Assignee: VASOPHARM BIOTECH GMBH (VASO-N); VASOPHARM BIOTECH GMBH &
CO KG (VASO-N)

Inventor: DRUECKES P; JARCHAU T; WALTER U; BADER B

Number of Countries: 095 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200196594	A2	20011220	WO 2001EP6621	A	20010612	200213 B
DE 10029210	A1	20020131	DE 1029210	A	20000614	200216
AU 200163956	A	20011224	AU 200163956	A	20010612	200227

Priority Applications (No Type Date): DE 1029210 A 20000614

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 200196594	A2	G	32	C12Q-001/00	
--------------	----	---	----	-------------	--

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA
CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS
JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL
PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR
IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW

DE 10029210	A1			C12Q-001/48	
-------------	----	--	--	-------------	--

AU 200163956	A			C12Q-001/00	Based on patent WO 200196594
--------------	---	--	--	-------------	------------------------------

Abstract (Basic): *WO 200196594* A2

NOVELTY - Test system (A), suitable for high throughput screening (HTS), for detecting activity of cyclonucleotide-dependent protein kinase (I) comprising at least one each of test compound, substrate (II) for (I), composition containing (I) and ATP (adenosine triphosphate), and a detection system for quantitative determination of the amount of phosphorylated (II), is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) similar system (Aa) for VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) phosphatase (Ia), comprising test compound, substrate (IIa) for (Ia), (Ia) and system for quantitative determination of dephosphorylated (IIa);

(2) preparing (A) and (Aa);

(3) HTS method for identifying compounds that modulate activity of (I) or (Ia); and

(4) diagnostic determination of (I) or (Ia) activity in a sample.

USE - The method is used for diagnosis of cardiovascular diseases and diseases associated with vascular injury, e.g. hypertension, thrombosis and endothelial defects (arteriosclerosis, diabetes or vasculitis) or diseases of hematopoietic cells, e.g. leukemia, myeloproliferation and myelodysplasia, and to screen for agents that

modify activity of (I) or VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) phosphatase (Ia), potentially useful as therapeutic agents.

ADVANTAGE - The system allows simple, rapid and automated screening of a large number of compounds, without the need for either radioactivity or separation of products.

pp; 32 DwgNo 0/4

Title Terms: TEST; SYSTEM; DETECT; KINASE; PHOSPHATASE; ACTIVE; USEFUL;

DIAGNOSE; CARDIOVASCULAR; DISEASE; SCREEN; SPECIFIC; MODULATE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/00; C12Q-001/48

International Patent Class (Additional): C12Q-001/42

File Segment: CPI

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/96594 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: **C12Q 1/00**
(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/06621**
(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juni 2001 (12.06.2001)
(25) Einreichungssprache: **Deutsch**
(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
(30) Angaben zur Priorität:
100 29 210 0 14. Juni 2000 (14.06.2000) **DE**
(71) Anmelder (nur alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **VASOPHARM BIOTECH GMBH [DE/DE];**
Schulstrasse 27, 97082 Würzburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** TEST SYSTEM FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF CYCLO-NUCLEOTIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASES AND VASP PHOSPHATASES

(54) **Bezeichnung:** TESTSYSTEM ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON CYCLO-NUKLEOTID-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN UND VASP-PHOSPHATASEN

(57) **Abstract:** The invention relates to an HTS-appropriate test system for detecting the activity of cyclo-nucleotide-dependent protein kinases (cNPK) containing: a) at least one test compound; b) at least one appropriate cNPK substrate; c) at least one composition, which is to be incubated and which contains cNPK and ATP, optionally, phosphorylation reaction stoppers, and; d) an appropriate detection system for quantifying the phosphorylation of the cNPK substrate. The invention also relates to an HTS-appropriate test system for detecting the activity of VASP phosphatases containing: e) at least one test compound; f) at least one appropriate VASP phosphatase substrate; g) at least one composition, which is to be incubated and which contains VASP phosphatase, and; h) an appropriate detection system for quantifying the dephosphorylation of the VASP phosphatase substrate. The described test systems can be used for locating compounds, which modulate the activity of a cNPK or of a VASP phosphatase, from chemical or natural substance libraries.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität von cyclo-Nucleotid-abhängigen Proteinkinasen (cNPK) enthaltend a) mindestens eine Testverbindung, b) mindestens ein geeignetes cNPK-Substrat, c) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend cNPK und ATP, ggf. Phosphorylierungsreaktionsstopper, und d) ein geeignetes Detektionssystem zur Quantifizierung der Phosphorylierung des cNPK-Substrats. Ferner wird ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität von VASP-Phosphatase beschrieben enthaltend e) mindestens eine Testverbindung, f) mindestens ein geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat, g) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase, und h) ein geeignetes Detektionssystem zur Quantifizierung der Dephosphorylierung des VASP-Phosphatase-Substrats. Die beschriebenen Testsysteme lassen sich zum Auffinden von Verbindungen, die die Aktivität einer cNPK oder einer VASP-Phosphatase modulieren, aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken einsetzen.

WO 01/96594 A2

Beschreibung

Testsystem zur Bestimmung der Aktivität von cyclo-Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen und VASP-Phosphatasen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem zum Nachweis der Aktivität von cyclo-Nucleotid-abhängigen Proteinkinasen oder von Phosphatasen, die das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein („VASP“) dephosphorylieren, Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung in (High Throughput) Screening Verfahren.

Cyclo-Nucleotid-abhängige Proteinkinasen („cNPK“), deren Substrate („cNPKS“), sowie die entsprechenden Proteinphosphatasen, sind Teil wichtiger physiologisch, pathophysiologisch und pharmakologisch relevanter zellulärer Signalwege (vergl. Zitate 1, 2 und 3). Zu den cNPK zählen cAMP-abhängige Proteinkinasen („cAK“) und cGMP-abhängige Proteinkinasen („cGK“). Neben anderen cGMP-Effektorsystemen, wie z.B. cGMP-regulierten Phosphodiesterasen und Ionenkanälen, ist insbesondere die cGK ein wichtiger Mediator der cGMP-vermittelten Signalübertragung.

Bei den Signalen, die zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels führen, unterscheidet man solche, die dies durch membranständige Guanylylzyklen (GC-A, GC-B, GC-C) bewirken, wie z.B. durch natriuretische Peptide (kurz: ANP, BNP, CNP) und Enterotoxin/Guanylin, und jene, die die lösliche Guanylylcyclase (GC-S) aktivieren. Zu den wichtigsten Agonisten der löslichen Guanylylcyclase zählt das von den NO-Synthasen (NOS I-III) gebildete Stickstoffmonoxid (NO). Zu den etablierten Effekten, die durch eine cGMP-Erhöhung bewirkt werden, gehören u.a. die Relaxation glatter Muskelzellen (SMCs) sowie Hemmung der Blutplättchenaktivierung. Diese cGMP-Effekte werden durch die cGK (Typ I) vermittelt (vergl. Zitate 1-3). Dies konnte in entsprechenden Mausmodelle mit cGK-I-Defizienz bestätigt werden (vergl. Zitate 4 und 5).

BESTÄTIGUNGSKOPIE

cGK sind als Homodimere bekannt, von denen eine lösliche (Monomer 76 kDa; cGK I) und eine membranständige Form (Monomer 86 kDa; cGK II) unterschieden werden können. Die Membranverankerung der cGK II wird über die N-terminale Myristoylierung vermittelt (vergl. Zitate 1-3). Von der cGK I existieren zwei Isoformen cGK I α und cGK I β . Interessanterweise ist die cGK I, die allgemein als lösliche Form bezeichnet wird, in Blutplättchen überwiegend und in glatten Muskelzellen teilweise partikulär vorhanden. Eine besonders hohe Expression der cGK I findet man in humanen Blutplättchen und in den glatten Muskelzellen. Eine Aktivierung der cGK-I in diesen Zellen führt zu den bereits weiter oben beschriebenen Effekten, wie Senkung des intrazellulären Ca(2+)-Spiegels, Hemmung der Blutplättchen sowie der Kontraktion glatter Muskelzellen.

Zu den bekannten Substraten von cGK zählen neben anderen z.B. der Inositol 1,4,5-triphosphat Rezeptor (IP3R) und das VASP, sowie p25, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) und 6-Pyruvoyltetrahydro-pterinsynthase (PTPS) .

Störungen des ANF / NO / cGMP-Signalweges sind für die verschiedenen Formen der Atherosklerose und Hypertonie bekannt, und die sogenannte „Endotheliale Dysfunktion“, eine gestörte Endothel-vermittelte Vasodilatation, ist ein frühes Merkmal von Gefäßkrankheiten assoziiert mit Atherosklerose, Hypertonie und Diabetes (vergl. Zitate 6 und 7). Aktuelle Hinweise belegen, daß in diesen Gefäßkrankheiten insbesondere die Aktivierung und/oder Expression der löslichen Guanylylcyclase pathologisch vermindert ist (vergl. Zitate 8-10). Daraus folgt zwingend, daß Verbindungen/Substanzen, die den NO/cGMP-Signalweg ersetzen können, von größter therapeutischer Bedeutung sind. Dies wird belegt durch den Erfolg der NO-Donoren wie Nitroprussid, Nitroglycerin, Molsidomine und seit neuestem durch NO-unabhängige sGC-Aktivatoren wie YC-1 und Derivate. Trotz dieser erprobten Mittel besteht ein großer Bedarf an zusätzlichen, neuen Substanzen, da es ungelöste Probleme gibt (Toleranzentwicklung, toxische Nebeneffekte etc). Wünschenswert wäre daher die direkte Aktivierung der cGK, und zwar vorzugsweise cGK-I, da diese nach wie vor in pathologisch veränderten Gefäßabschnitten exprimiert wird (vergl. Zitat 10-11). Die Tatsache, daß nicht alle durch NO, bzw. cGMP bewirkten Effekte durch cGK vermittelt werden, birgt das Potential, daß sich spezifisch nur einige der ansonsten breiten

Effekte dieses Signalweges beeinflussen lassen und damit einige unerwünschte Nebeneffekte wohl ausbleiben. Bisher sind nur zellmembranpermeable cGMP-Analoga (z.B. 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP) als Aktivatoren der cGK beschrieben worden, während gewisse cGMP-Analoga (Rp-8Br-PET-cGMPS, Rp-8-pCPT-cGMPS) und Isoquinolinesulfonamiderivate (KT 5823, H8 and H89) die cGK hemmen (vergl. Zitat 12).

Ein High-Throughput-Screening Ansatz zur systematischen Suche nach unmittelbaren cGK-Aktivatoren und / oder Inhibitoren bzw. nach unmittelbaren Aktivatoren und/oder Inhibitoren der VASP-Phosphatase ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Peptiderge cNPK-Substrate und Inhibitoren werden aufwendig über kombinatorische Peptidbibliotheken gesucht (vergl. Zitat 13).

Im Stand der Technik werden cNPK-Assays üblicherweise durch Einbau von radioaktiven Phosphor-Isotopen (^{32}P oder ^{33}P) in Peptidsubstrate und anschließender Trennung dieser Reaktionsprodukte von den Edukten, z.B. durch ihre Immobilisierung auf eine Trägersubstanz (Zitat 16) durchgeführt oder durch Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese und einem radio- oder immunochemischen Nachweis nach Proteintransfer auf Membranen beim Vorhandensein produktspezifischer Antikörper (wie z.B. im Western-Blot, WO 99/24,473). Eine Quantifizierung der gebildeten Produktkonzentrationen ist im letzten Fall technisch besonders aufwendig und wenig zuverlässig nur als semiquantitative Relativbestimmung zu einem gewählten Standard möglich und somit zur exakten Bestimmung von Enzymaktivitäten nicht durchführbar. Nachteilig können dabei die Be- und Entsorgung von radioaktiven Isotopen in den hierfür notwendigen Mengen, welche eine kostenintensive und sicherheitstechnische Belastung darstellt, sein. Zum anderen benötigt die Messung radioaktiver Proben mit der erforderlichen Genauigkeit relativ viel Zeit. Insbesondere sind Gele materiell aufwendig und mit hohem zeitlichen Aufwand zu bearbeiten.

Da die im Stand der Technik bekannten Methoden Separations- und Waschschriffeinhalten, sind diese ungeeignet im Hinblick auf die Untersuchung einer großen Anzahl von Testverbindungen mit Hilfe von automatisierten Systemen.

Als besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung hat sich herausgestellt, dass das beschriebene Testsystem (synonym: Assay oder Diagnostikum) geeignet ist, auf einfache Art und Weise eine große Anzahl von (Test)-Verbindungen, vorzugsweise aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken, auf ihre Wirkung auf die Aktivität einer cNPK untersuchen zu können [sog. High Throughput Screening (kurz: HTS)].

Als weiterer besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung hat sich herausgestellt, dass mit dem Testsystem auf einfache und effektive Art und Weise eine große Anzahl von (Test)-Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung auf die Aktivität einer VASP-Phosphatase untersucht werden können [sog. High Throughput Screening (kurz: HTS)].

Es wurde nun gefunden, dass im beschriebenen Testsystem auch ohne Auftrennung der Produkte und ohne die Verwendung von radioaktiven Phosphor-Isotopen (^{32}P oder ^{33}P) ein Nachweis der Aktivität einer cNPK bzw. einer Proteinphosphatase möglich ist, der die oben beschriebenen Nachteile im Stand der Technik überwindet und somit für das HTS beispielsweise in einer automatisierten Anlage geeignet ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität einer cNPK enthaltend

- a) mindestens eine Testverbindung
- b) mindestens ein geeignetes cNPK-Substrat (cNPKS)
- c) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend cNPK und ATP, und
- d) ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des phosphorylierten cNPK-Substrats.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität der VASP-Phosphatase enthaltend

- e) mindestens eine Testverbindung,
- f) mindestens ein geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat,
- g) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase, und

- h) ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des dephosphorylierten VASP-Phosphatase-Substrats.

Beide genannten Gegenstände werden nachstehend als erfindungsgemäßes Testsystem bezeichnet.

Das erfindungsgemäße Testsystem ermöglicht als gelfreies Testsystem eine hohe Zahl an quantitativen Einzelbestimmungen und erfüllt durch seinen Verzicht auf gelelektrophoretische Trennschritte besondere Anforderungen hinsichtlich Geschwindigkeit, Probengröße und Materialverbrauch. Zudem werden Reproduzierbarkeit, Robustheit, Lösungsmitteltoleranz und Automatisierung gewährleistet.

Das erfindungsgemäße Testsystem gestattet die Suche nach einer oder mehreren, gleichen oder verschiedenen Testverbindungen.

Die eingesetzte cNPK ist vorzugsweise eine cGK oder cAK oder eine funktionelle Variante mit der Aktivität einer cNPK. Solche Proteinkinasen können in gereinigter Form oder als Rohextrakt eingesetzt werden, insbesondere als Bestandteil in Proteinmischungen aus Homogenaten biologischen Ursprungs, vorzugsweise humanen Ursprungs.

Die eingesetzte VASP-Phosphatase kann ebenfalls eine funktionelle Variante mit der Aktivität einer VASP-Phosphatase sein. VASP-Phosphatasen können in gereinigter Form oder als Rohextrakt eingesetzt werden, insbesondere als Bestandteil in Proteinmischungen aus Homogenaten biologischen Ursprungs, vorzugsweise humanen Ursprungs.

Ganz besonders bevorzugt als geeignetes cNPK-Substrat gemäß Merkmal (b) ist VASP - gemäß SEQ ID No. 1 (beschrieben in C. Haffner et al. in EMBO J., 14(1), 19-27 (1995)) - enthaltend bevorzugt bedienbare Phosphorylierungsstellen und zwar: Serin-157, Serin-239 und Threonin-278. Grundsätzlich können cNPK alle drei Reste phosphorylieren, jedoch bevorzugt die cAMP-abhängige Proteinkinase Serin 157 als Hauptphosphorylierungsstelle, während die cGMP-abhängige Proteinkinase

Serin-239 bevorzugt. Threonin-278 wird von beiden Kinasen mit vergleichbarer Spezifität phosphoryliert.

Ganz besonders bevorzugt als geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat gemäß Merkmal (b) ist phosphoryliertes VASP, entsprechend SEQ ID No. 1, welches an den bevorzugt bedienbaren Phosphorylierungsstellen phosphoryliert ist und zwar: Serin-157, Serin-239 und Threonin-278.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Testsystems können ebenfalls solche Peptid- oder Polypeptidvarianten oder Peptoide als funktionelle Varianten eines cNPK-Substrates oder eines VASP-Phosphatase-Substrats verwendet werden, die vorzugsweise Aminosäuresequenzen aus VASP enthalten, die in der Umgebung der genannten Phosphorylierungsstellen oder Dephosphorylierungsstellen vorhanden sind und zwar nicht abschließend besonders bevorzugt die Pentamere mit den Aminosäuren 155 – 159 und / oder 237 – 241 und / oder 276 – 280 gemäß SEQ ID No. 1 oder bevorzugt die Decamere mit den Aminosäuren 152 – 161 und / oder 234 – 243 und / oder 273 – 282 aus SEQ ID No. 1 oder andere geeignete Teilsequenzen (z.B. vgl. in Fig. 1).

Solche erfindungsgemäß phosphorylierten Peptide können besonders vorteilhaft mit geeigneten Antikörpern im Sinne der Merkmale (d) bzw. (h), vorzugsweise monoklonalen Antikörpern, nachgewiesen werden.

Ganz besonders bevorzugt wird erfindungsgemäß der monoklonale Antikörper 16C2, welcher ausgewählt und erhältlich ist aus der Hybridom-Zelllinie DSM ACC2330, eingesetzt (WO 99/24473). Dieser Antikörper oder eine funktionelle Variante davon weist spezifisch ein Phosphorylierungsereignis nach, ganz besonders bevorzugt erkennt er ein Epitop, welches das phosphorylierte Serin-239 der VASP-Sequenz enthält. Eine funktionelle Variante betrifft insbesondere solche Antikörper mit einer Übereinstimmung von vorzugsweise 90 – 99 % oder 70 – 90 % in der Aminosäuresequenz von 16C2 mit der homologen Funktion ein Reaktionsprodukt im Sinne des Merkmals (d) bzw. (h) quantitativ zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Testsystem kann sowohl heterogen (z.B. nach Immobilisierung der Reaktionsprodukte) jedoch bevorzugt homogen gefahren werden. Entsprechend der Durchführungsweise kann die immunologische Detektion im Sinne der Merkmale (d) bzw. (h) nach den dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen, wie z.B. gekoppelter Enzymreaktion (alkalische Phosphatase oder Luziferase) oder allgemeinen Sandwichtechnologien (beispielsweise ELISA), sowie fluorimetrischen Methoden (Fluoreszenz, zeitaufgelöste Fluoreszenz, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)).

Bevorzugt sind leicht detektierbare radioaktiv markierte oder besonders bevorzugt nicht-radioaktiv markierte, insbesondere fluoreszenzmarkierte, Antikörper. Besonders geeignet sind Lanthanid-Chelate. Besonders vorteilhaft kann zudem auf die zeitaufgelöste Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik zugegriffen werden (Figur 1). Solche TR-FRET Systeme sind in WO 97/29373 und WO 98/15830 beschrieben und kommerziell über Wallac Oy (Turku, FI) erhältlich. Vgl ebenfalls „Miniaturization of a Lance™-assay“ und „Use of Generic Reagent in Lance™“ veröffentlicht bei Wallac Oy, Turku, FI.

Bevorzugt kann jedoch das erfindungsgemäße Testsystem als homogenes HTS automatisiert werden und ist daher für 96, 384, 1536-well Platten und mehr geeignet.

Zur Durchführung der Untersuchungen ist es bevorzugt, weitere Hilfsmittel, wie z. B. Pufferlösungen, Stabilisatoren und/oder Energieäquivalente, insbesondere ATP, einzusetzen.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein Verfahren zur Herstellung eines Testsystems, bei dem mindestens eine zu untersuchende Verbindung und mindestens eine Zusammensetzung enthaltend cNPK, ATP und cNPK-Substrat, ggf. ein Phosphorylierungsreaktionsstopper, mindestens ein geeignetes Detektionssystem, wie ein Antikörper samt immunologischem Detektionsmittel und ggf. weitere Hilfsmittel zusammengestellt werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Herstellung eines Testsystems, bei dem mindestens eine zu untersuchende Verbindung, mindestens

eine Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase und mindestens ein geeignetes Detektionssystem zur Quantifizierung der Dephosphorylierung eines VASP-Phosphatase-Substrats zusammengestellt werden.

Bevorzugte Ausführungsformen der einzelnen Komponenten sind bereits oben näher beschrieben worden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein HTS-geeignetes Verfahren zum Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Verbindungen, die die Aktivität der cNPK moduliert, umfassend die Schritte:

- i) in Kontakt bringen der zu untersuchenden Verbindung oder einer Vielzahl von zu untersuchenden Verbindungen mit cNPK, ATP und geeignetem cNPK-Substrat, und
- j) Quantifizierung des phosphorylierten cNPK-Substrats mit einem geeigneten Detektionssystem, gegebenenfalls nach Abbruch der Phosphorylierungsreaktion mit einem geeigneten Phosphorylierungsreaktionsstopper.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein HTS-geeignetes Verfahren zum Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Verbindungen, die die Aktivität der VASP-Phosphatase modulieren, umfassend die Schritte:

- k) in Kontakt bringen der zu untersuchenden Verbindung oder einer Vielzahl von zu untersuchenden Verbindungen mit VASP-Phosphatase und geeignetem VASP-Phosphatase-Substrat, und
- l) Quantifizierung des dephosphorylierten VASP-Phosphatase-Substrats mit einem geeigneten Detektionssystem, gegebenenfalls nach Abbruch der Dephosphorylierungsreaktion mit einem geeigneten Dephosphorylierungsreaktionsstopper

Das Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung wie vorstehend beschrieben erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform in einer Mikrotiterplatte. Die Mikrotiterplatte kann dabei unterschiedlich viele Gefäße enthalten. Beispielsweise kann diese 96, 384, 768, 1536, 3072 oder mehr Gefäße enthalten. Bevorzugte einzelne Komponenten des erfindungsgemäßen Verfahrens sind oben bereits näher beschrieben.

Die wirksame (Test-)Verbindung kann hierbei eine pharmazeutisch wirksame Verbindung und zwar in der Funktion eines Modulators - wie (Hyper)Aktivator / oder (Total)Inhibitor - für die Aktivität einer cNPK sein oder ein Naturstoff im weitesten Sinne sein, insbesondere ein Roh-Extrakt, oder eine darin enthaltene Komponente. Die zu untersuchende Substanz ist im allgemeinen eine natürlich vorkommende, eine natürlich vorkommende und chemisch modifizierte und/oder eine synthetische Substanz. Insbesondere können mit den erfindungsgemäßen Verfahren besonders einfach und schnell sogenannte kombinatorische Substanzbibliotheken durchsucht werden.

Ganz besonders bevorzugt ist eine solche Verbindung geeignet, die unter Umgehung des NO/cGMP Signalweges eine cNPK direkt moduliert - aktiviert oder inhibiert; ggf. selektiv moduliert - aktiviert oder inhibiert.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren, wobei die pharmazeutisch wirksame Verbindung einen cNPK-Signalweg moduliert.

In der Beschreibungseinleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß verschiedene Erkrankungen auf eine Störung der Cyclo-Nucleotid-abhängigen Proteinkinasen (cNPK) zurückzuführen sind. Daher eignet sich die vorliegende Erfindung ebenfalls zur Diagnose einer Erkrankung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Diagnose durch die direkte und Gelelektrophorese-unabhängige Bestimmung der cNPK-Aktivität aus Proben, umfassend die Schritte:

- m) Inkubieren einer Probe in Gegenwart mindestens einer Zusammensetzung enthaltend geeignetes cNPKS und ggf. ATP,
- n) Versetzen der Zusammensetzung mit mindestens einem geeigneten Detektionssystem zur Quantifizierung der Phosphorylierung des cNPKS; und
- o) Bestimmung der Aktivität der cNPK, insbesondere in Blut-/Zell- oder Gewebe-Extrakten oder in Form von permeabilisierten und/oder intakten Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose durch die direkte und Gelelektrophorese-unabhängige Bestimmung der VASP-Phosphatase-Aktivität aus Proben, umfassend die Schritte:

- p) Inkubieren einer Probe in Gegenwart mindestens einer Zusammensetzung enthaltend geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat
- q) Versetzen der Zusammensetzung mit mindestens einem geeigneten Detektionssystem zur Quantifizierung der Dephosphorylierung des VASP-Phosphatase-Substrats; und
- r) Bestimmung der Aktivität der VASP-Phosphatase, insbesondere in Blut-/Zell- oder Gewebe-Extrakten oder in Form von permeabilisierten und/oder intakten Zellen.

Die zu diagnostizierenden Erkrankungen sind hierbei vorzugsweise Herz-Kreislaufkrankungen und Krankheiten mit assoziierten Gefäßschäden, z.B. Hypertonie, Thrombose und das Syndrom der endothelialen Dysfunktion, z.B. bei Arteriosklerose, Diabetes, Vaskulitiden und Erkrankungen hämatopoetischer Zellen, wie z.B. akute Leukämien, myeloproliferative Erkrankungen, Myelodysplasien (vgl. Zitat 17).

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

Figur 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Testsystems. Der cGK-Aktivitätsassay beruht auf der Beobachtung der in vitro Phosphorylierung eines biotinylierten Substratpeptids durch aktivierte cGK (vergleiche Figur 1 A). Das VASP-Substratpeptid besteht aus einer Teilsequenz der Aminosäuresequenz von humanem VASP (Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein), einem natürlichen cGK-Substratprotein. Das phosphorylierte VASP-Substratpeptid ließ sich überraschenderweise mit Hilfe eines Detektionssystems nachweisen, das auf zeitaufgelöstem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beruht (vergleiche Figur 1 B). Dabei waren Hauptkomponenten mit folgenden chemischen Eigenschaften in einem besonderen Mischungsverhältnis in dem Detektionssystem vorhanden:

1. Der anti-pSer239-VASP (mAb 16C2) monoklonale Antikörper, der erstauilicherweise spezifisch das phosphorylierte VASP-Substratpeptid erkannte (und nicht-phosphoryliertes VASP-Substratpeptid unerkant lieB).
2. Ein Europium-markierter anti-Maus IgG Zweitantikörper, der spezifisch an den anti-pSer239-VASP (mAb 16C2) binden kann.

3. Fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (SA-APC), das die Biotingruppe des VASP-Substratpeptids binden kann.

Bei einem besonderen Mischungsverhältnis aller drei Komponenten und des phosphorylierten VASP-Substratpeptids und bei geeigneter Lichtanregung (340 nm) des Europium-markierten Antikörpers wurde ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf die zweite Fluoreszenzkomponente, SA-APC, gefunden, deren Lichtemission bei 660 nm beobachtet werden konnte. Dieses Testsystem besaß die in den folgenden Figuren und Beispielen beobachteten, interessanten Eigenschaften.

Figur 2 zeigt die Kinetik der Phosphorylierung des biotinylierten Substrat-Peptids durch die cGK. Die Ordinate der Figur 2 zeigt das gemessene FRET-Signal in cps. Das VASP-Substratpeptid wird nur in Anwesenheit der cGK und ihres Aktivators cGMP phosphoryliert (Gefäß A). Ohne cGMP und mit cGK (Gefäß B) sowie ohne cGK und mit cGMP (Gefäß C) wurde keine Signaländerung beobachtet.

Figur 3 zeigt die Aktivierung der cGK mit dem natürlichen Aktivator cGMP sowie einem cGMP-analogen Molekül (8-pCPT-cGMP), gemessen mit dem beschriebenen Testsystem. Die Enzymaktivität (in cps/min) ist gegen die Aktivatorkonzentration (in mol/l) aufgetragen.

Figur 4 zeigt den überraschenden Befund, dass mit dem erfindungsgemäßen Testsystem die in Thrombozytenextrakten enthaltene cGK in ihrer Enzymaktivität in dieser komplexen biologischen Proteinmischung beobachtet und quantitativ vermessen werden kann. Figur 4A zeigt keinen Unterschied zwischen der Phosphorylierungskinetik ohne (\square) und mit dem spezifischen cAK-Inhibitor PKI (\times). In Figur 4B ist der Einfluß von 100 nmol/l PKI auf die Phosphorylierung des VASP-Substratpeptids durch gereinigte cGK (0.3 nmol/l) ohne (\square) und mit PKI (\times) sowie der Einfluß von PKI auf gereinigte cAK (katalytische Untereinheit, 3 nmol/l) ohne (\circ) und mit PKI (\bullet) dargestellt.

Beispiel 1: FRET-Detektionssystem und Titration des Meßbereichs mit Phosphopeptid

Zur Etablierung und Optimierung des Detektionssystems wurde anstatt einer Kinase-reaktion ein synthetisches Phospho-Peptid (phosphorylierte Version des VASP-Substratpeptids) als "Reaktionsprodukt" eingesetzt und mit Detektionsmix quantifiziert. Um den linearen Meßbereich zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mischungen aus nicht-phosphoryliertem Peptid und Phospho-Peptid hergestellt. Dabei wurde die Gesamtkonzentration an Peptid konstant bei 500 nmol/l gehalten. 50 μ l dieser Mischungen wurden in die Vertiefungen einer "96 well" Mikrottestplatte gegeben und mit je 200 μ l eines Detektionsmix versetzt, der folgende Reagenzien, verdünnt in PBS, enthielt:

anti-pSer239-VASP (mAb 16C2)	1 nmol/l
anti-Maus-Eu(W1024, PE Wallac)	1 nmol/l
Streptavidin-APC	2 μ g/ml
Rinderserumalbumin	0.1 g/l

Die Messung des zeitaufgelösten FRET-Signals bei Anregung der Europium Fluoreszenz bei 340 nm und Messung der Emission der APC-Fluoreszenz bei 660 nm erfolgte nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 20°C mit Hilfe eines PerkinElmer Wallac Fluoreszenzmeßgerätes (Victor²). Folgende Tabelle zeigt einen nahezu linearen Anstieg zwischen 0-100 nmol/l Phospho-Peptid. Bei 160 nmol/l Phospho-Peptid kann das Signal nicht weiter gesteigert werden.

Tabelle 1: Titration des Meßbereichs mit Phospho-Peptid

Konzentration Phospho-Peptid	Stoffmenge in 100 μ l	FRET-Signal
nmol/l	Pmol	Cps
0	0	6218
10	1	7219
20	2	9872

40	4	15358
80	8	26720
160	16	30725
320	32	29923

Das Signal-Hintergrund Verhältnis, definiert durch den Quotienten aus Maximalsignal und Signal ohne Phospho-Peptid, lag bei etwa 5. Für die Detektion in "384 well" Platten ergab sich ein optimales Signal / Hintergrund Verhältnis, wenn 20 μ l einer Lösung enthaltend 500 nmol/l VASP-Substratpeptid mit 40 μ l eines Detektionsmix, der die oben angegebenen Konzentrationen der Detektionsreagenzien enthielt, gemischt wurden. Dieses Protokoll wurde bei allen weiteren Experimenten verwendet.

Beispiel 2: Quantifizierung der Enzymaktivität

Die in Beispiel 1, Tabelle 1 gefundene Linearität des Meßbereichs bei Titration mit Hilfe von synthetisch hergestelltem Phospho-Peptid ermöglicht die Standardisierung und Quantifizierung der enzymatischen Kinasereaktionen auf Basis des erfindungsgemäßen Testsystems. Das Meßsignal, ausgedrückt in cps, kann direkt umgerechnet werden in molare Konzentration an phosphoryliertem Peptid, wodurch die mit dem beschriebenen Testsystem gemessene Aktivität in internationalen Enzymeinheiten (1 Unit = 1 μ mol/min) umgerechnet werden kann.

Die Aktivität einer in einem Volumen von 100 μ l durchgeführten Enzymreaktion, bei der innerhalb von 2 Minuten ein Signal von 9872 cps gemessen wird, entspricht also einer Aktivität, die 2 pmol Substrat in 2 Minuten umsetzt, was einer Enzymaktivität von 1×10^{-6} U entspricht.

Beispiel 3: Kinase Reaktion

Bei den üblichen radioaktiven Kinase-Assays werden hohe Konzentrationen an VASP-Substratpeptid (50-100 μ mol/l) und Enzym benötigt (vergl. Zitat 16). Unter Verwendung des in Figur 1 beschriebenen Testsystems konnte bei hohen Substratpeptid-Konzentrationen keine Kinase-Aktivität detektiert werden. Durch Verringern

der Substratkonzentration auf 1 $\mu\text{mol/l}$ konnten erstmals auch mit der FRET-Detektion Enzymkinetiken gemessen werden (vergl. Figur 2).

Der Einsatz hoher Enzymkonzentrationen bei niedriger Substratkonzentration führte jedoch zur Erhöhung der nicht-stimulierten Basalaktivität der Kinase, das heißt auch ohne den spezifischen Aktivator cGMP wurde Aktivität gemessen, die durch Zugabe von cGMP nicht oder nur geringfügig gesteigert werden konnte. Dieses Problem konnte durch Verringern der Enzymkonzentration auf 50 ng/ml und weniger überwunden werden (vergl. Zitat 14). Somit kann mit dem erfindungsgemäßen Testsystem die authentische Enzymaktivität der cGK gemessen werden.

In drei Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten gemischt:

Tris/HCl, pH 7.4	20 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
β -Mercaptoethanol	5 mmol/l
BSA	0.01 g/l
biotinyliertes VASP-Substratpeptid (biotin-VASP 231-245)	1 $\mu\text{mol/l}$

Gefäß A enthielt darüberhinaus 5 $\mu\text{mol/l}$ cGMP sowie 25 ng/ml gereinigte cGK.

Gefäß B enthielt darüberhinaus 25 ng/ml gereinigte cGK.

Gefäß C enthielt darüberhinaus 5 $\mu\text{mol/l}$ cGMP.

Nach Vorinkubation der Gefäße bei 30°C für 5 Minuten, wurde die Kinasereaktion mit 50 $\mu\text{mol/l}$ ATP gestartet mit weiterer Inkubation bei 30°C. Alle oben angegebenen Konzentrationen sind als Endkonzentrationen in einem Volumen von 500 μl zu verstehen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden zur Beendigung der Reaktion 50 μl aus den Gefäßen entnommen und mit 50 μl einer 30 mmol/l EDTA Lösung gemischt. Die Detektion des phosphorylierten Substratpeptids erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben in den Vertiefungen einer "384 well" Mikrottestplatte.

Aus Figur 2 ist ersichtlich, dass das VASP-Substratpeptid nur in Anwesenheit der cGK und ihres Aktivators cGMP phosphoryliert wird (Gefäß A). Ohne cGMP und mit

cGK (Gefäß B) sowie ohne cGK und mit cGMP (Gefäß C) wurde keine Signaländerung beobachtet.

Beispiel 4: Eignung für das HTS

Das erfindungsgemäße Testsystem ist in der dargestellten Form für das Hochdurchsatz-Screening geeignet. Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Pipettierrobotern (z.B. die Biomek Systeme der Firma Beckman, oder die Genesis Workstation der Firma Tecan) können Mikrottestplatten im 96, 384 und sogar 1536 well Format prozessiert werden. Der cGK-Assay könnte zum Screening nach Aktivatoren der cGK folgendermaßen auf ein solches Robotersystem im 384 well Format implementiert werden. Sequentiell werden pipettiert:

1. 20 μ l einer Lösung enthaltend Puffer, cGK, Substratpeptid
2. 5 μ l einer Testsubstanz in DMSO
3. Start der Reaktion mit 5 μ l einer ATP-Lösung
4. Stop der Reaktion durch gleichzeitige Zugabe von EDTA und den Detektionsreagenzien.

Die meisten Substanzen, die im HTS getestet werden, liegen gelöst vorzugsweise in DMSO vor. Viele Enzyme oder Testsysteme sind jedoch sehr sensitiv gegenüber DMSO. Um den Einfluß von DMSO auf das erfindungsgemäße Testsystem zu ermitteln, wurden Phosphorylierungskinetiken, wie in Beispiel 2 (vgl. Figur 2) beschrieben, in Anwesenheit von 0, 5, 10, 15 und 20 % DMSO durchgeführt. Tabelle 2 faßt die nach einer Inkubationszeit von 10 min erhaltenen Enzymaktivitäten zusammen. Das erfindungsgemäße Testsystem stellt sich in dieser Beziehung als sehr robust dar. Zugabe von bis zu 20 Volumenprozent DMSO haben keinen wesentlichen Einfluß auf die Reaktion.

Tabelle 2: Einfluß von DMSO auf die Enzymaktivität im erfindungsgemäßen Testsystem

Volumenprozent DMSO	Enzymaktivität in cps/min
0	2248
5	2282
10	2253
15	2218
20	1988

Beispiel 5: Aktivierungskurve der cGK

Die Dosis-abhängige Aktivierung der cGK durch den natürlichen Aktivator cGMP und ein cGMP-analoges Molekül (8-pCPT-cGMP) kann mit dem erfindungsgemäßen Testsystem analysiert werden. Es wurden 8 Kinase-Reaktionen (wie in Beispiel 3 beschrieben, Gesamtvolumen 500 μ l) durchgeführt, die folgende Komponenten enthielten:

20 mmol/l Tris/HCl, pH 7.4

10 mmol/l $MgCl_2$

5 mmol/l β -Mercaptoethanol

0.01 g/l BSA

1 μ mol/l biotinyliertes VASP-Substratpeptid (biotin-VASP 231-245)

25 ng/ml cGK

50 μ mol/l ATP

verschiedene Konzentrationen cGMP oder 8-pCPT-cGMP von 10^{-9} – 10^{-5} mol/l

Nach 0, 5, 10, 20, 60 Minuten Inkubation bei 30°C wurden Teilvolumina von 50 μ l entnommen und mit 50 μ l 30 μ mol/l EDTA gemischt. Die Detektion des phosphorylierten Substratpeptids erfolgte dann wie in Beispiel 2 beschrieben. Aus den Kineti-

ken der Phosphorylierung des VASP-Substratpeptids wurden die jeweiligen initialen Geschwindigkeiten in cps/min bei verschiedenen Aktivatorkonzentrationen berechnet. Diese sind in Figur 3 gegen die Aktivatorkonzentration aufgetragen.

Die mit dem erfindungsgemäßen Testsystem erhaltenen Aktivierungskurven und die daraus berechneten Aktivierungskonstanten für cGMP ($0,26 \mu\text{mol/l}$) und 8-pCPT-cGMP ($0,10 \mu\text{mol/l}$) sind vergleichbar mit für diese Substanzen veröffentlichten Daten, die mit konventionellen radioaktiven Methoden bestimmt wurden (vergl. Zitat 14).

Beispiel 6: Bestimmung der cGK-Aktivität in Gewebsextrakten

Das erfindungsgemäße Testsystem ist geeignet, spezifisch die Aktivität der cGK in Gewebsextrakten oder Thrombozytenlysaten zu messen.

Thrombozyten wurden nach bekannter Methode präpariert (vergl. Zitat 15). Nach Herstellung eines löslichen Thrombozytenextrakts wurde dieses ohne Aktivator und mit 8-pCPT-cGMP ($0.5 \mu\text{mol/l}$) gemäß Beispiel 3 getestet. Ein drittes Reaktionsgefäß enthielt neben 8-pCPT-cGMP zusätzlich noch 100 nmol/l PKI. Dieser Inhibitor inaktiviert spezifisch die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAK), die ebenfalls in Thrombozyten vorhanden ist. Figur 4A zeigt keinen Unterschied zwischen der Phosphorylierungskinetik ohne und mit PKI. In Figur 4B ist der Einfluß von 100 nmol/l PKI auf die Phosphorylierung des VASP-Substratpeptids durch gereinigte cGK (0.3 nmol/l) und gereinigte cAK (katalytische Untereinheit, 3 nmol/l) dargestellt. Die verwendete Konzentration an PKI reicht aus, um die cAK vollständig zu hemmen. Die Aktivität der cGK wird nicht beeinflusst.

Figuren 4A und 4B zusammen zeigen daher, dass das erfindungsgemäße Testsystem sehr spezifisch die cGK-Aktivität in komplexen Proben wie Thrombozytenlysaten messen kann. Eine Kreuzaktivität durch die cAK kann ausgeschlossen werden. Ebenso konnte in Gewebshomogenaten aus Rattenorganen cGK-Aktivität gemessen werden.

Im Text und Figuren verwendete Abkürzungen:

8-pCPT-	=	8-(4-Chlorophenylthio)-
cAMP	=	cyclo-Adenosin-3',5'-Monophosphat
APC	=	Allophycocyanin
ATP	=	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	=	Bovine-Serum-Albumin
cAK	=	cAMP-abhängige Proteinkinase
cGK	=	cGMP-abhängige Proteinkinasen
cGMP	=	cyclo-Guanosin-3',5'-Monophosphat
cNPKS	=	Substrat für Cyclo-Nuceotid-abhängige Proteinkinasen
cNPK	=	Cyclo-Nucleotid-abhängige Proteinkinasen
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
Eu	=	Europium
HTS	=	High-throughput-screening
LANCE	=	Lanthanide Chelate Excitation Technology
mAb	=	monoclonal antibody
PKI	=	Proteinkinase A spezifischer Inhibitor
SA	=	Streptavidin
TR-FRET	=	Time-Resolved-Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer
VASP	=	Vasodilator-stimulated Phosphoprotein

Im Text zitierte Literatur:

1. Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. and DeJonge, H.R. (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. TIBS 22, 307 – 312.
2. Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999) Structure and Function of cGMP-Dependent Protein Kinases. Rev Physiol Biochem Pharmacol 135, 105 – 149.
3. Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U and Pilz RB (1999) Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression, Rev Physiol Biochem Pharmacol 135, 173 – 209

4. Pfeiffer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneis C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, and Hofmann F (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 17, 3045 – 3051
5. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeiffer A, Siess W, Fässler R, Ruth P, Krombach F, and Hofmann F (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 189, 1255-1263
6. Ross R (1999) Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340, 115 – 126
7. Garbers DL, and Dubois, SK (1999) The Molecular Basis of Hypertension. *Annu Rev Biochem* 68, 127 – 155
8. Bauersachs J, Bouloumie A, Mulsch A, Wiemer G, Fleming I, and Busse R (1998) Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rat: changes in NO synthases III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovascular Res* 37, 772-779
9. Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH (1999) Down-regulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 85, 534-541
10. Bauersachs J (1999) Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression: role of enhanced superoxide production. *Circulation* 100, 292-298
11. Mönks D, Lange V, Silber RE, Markert T, Walter U and Nehls V (1998) Expression of cGMP-dependent protein kinase and its substrate VASP in neointimal cells of the injured rat carotid artery. *Eur J Clin Invest* 28, 416 – 423

12. Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM and Walter U (1998) Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedenberg's Arch Pharmacol* 358, 134-139
13. Dostmann WRG, Nickl C, Thiel S, Tsigelny I, Frank R and Tegge WJ (1999) Delineation of selective cyclic GMP-dependent protein kinase α substrate and inhibitor peptides based on combinatorial peptide libraries on paper. *Pharmacol Ther* 82, 373-387
14. Sekhar, K.R., Hatchett, R.J., Shabb, J.B., Wolfe, L., Francis, S.H., Wells, J.N., Jastorff, B., Butt, E., Chakinala, M.M., and Corbin, J.D. (1992). Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogs that selectively activate type I α , compared with type I β , cGMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 42: 103-8
15. Eigenthaler, M., Nolte, C., Halbrugge, M., and Walter, U. (1992). Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur. J. Biochem.* 205: 471-81
16. Roskoski, R., Jr. (1983). Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99: 3-6
17. Eigenthaler, M., Ullrich, H., Geiger, J., Horstrup, K., Honig-Liedl, P., Wiebecke, D., and Walter, U. (1993). Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem* 268: 13526-31.

Patentansprüche:

1. HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität der cyclo-Nucleotid-abhängigen Proteinkinasen (cNPK) enthaltend
 - a) mindestens eine Testverbindung,
 - b) mindestens ein geeignetes cNPK-Substrat (cNPKS),
 - c) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend cNPK und ATP, und
 - d) ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des phosphorylierten cNPK Substrats.
2. HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität der VASP-Phosphatase enthaltend
 - e) mindestens eine Testverbindung,
 - f) mindestens ein geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat,
 - g) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase, und
 - h) ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des dephosphorylierten VASP-Phosphatase-Substrats.
3. Testsystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Testsystem automatisierbar und heterogen mit Trennung oder Immobilisierung mindestens eines der Reaktionsprodukte oder Nachweisreagenzien ist.
4. Testsystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Testsystem automatisierbar und homogen ist.
5. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Testsystem nicht-radioaktiv ist.
6. Testsystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das cNPK-Substrat gemäß Merkmal (b) oder das VASP-Phosphatase-Substrat gemäß Merkmal (f) ausgewählt ist aus SEQ ID No. 1 oder einer funktionellen Variante davon.

7. Testsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das cNPK-Substrat ein Peptid, Polypeptid oder Peptoid ist enthaltend die Pentamere mit den Aminosäuren 155 – 159 und / oder 237 – 241 und / oder 276 – 280 aus SEQ ID No. 1 oder die Decamere mit den Aminosäuren 152 – 161 und / oder 234 – 243 und / oder 273 – 282 aus SEQ ID No. 1.
8. Testsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cNPK, vorzugsweise eine cAMP- und / oder cGMP-Kinase, oder eine funktionelle Variante davon ist.
9. Testsystem nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die cNPK in gereinigter Form, in Form von Blut-/Zell- oder Gewebe-Extrakten oder in Form von permeabilisierten und/oder intakten Zellen vorliegen.
10. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Detektionssystem zur Quantifizierung der Phosphorylierung des cNPK-Substrats oder der Dephosphorylierung des VASP-Phosphatase-Substrats mindestens einen geeigneten Antikörper für das phosphorylierte Produkt oder für das dephosphorylierte Produkt enthält.
11. Testsystem nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper durch die Hybridoma Zelllinie DSM ACC2330 gebildet wird, insbesondere der monoklonale Antikörper 16C2 ist oder eine funktionelle Variante davon.
12. Testsystem nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Detektionssystem zwei Antikörper aufweist, von denen der erste Antikörper unmarkiert und der zweite Antikörper markiert ist.
13. Testsystem nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Detektionssystem mindestens einen markierten Antikörper aufweist, sowie ein geeignetes System zum Nachweis der Markierung.
14. Testsystem nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper einen Fluorophor enthält.

15. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionssystem auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beruht, wobei mindestens ein markierter, vorzugsweise ein Fluorophor-markierter, Erst- oder Zweitantikörper und ein dazu korrespondierender Akzeptor- oder Donor-Fluorophor, vorzugsweise am cNPK-Substrat, verwendet werden.
16. Testsystem nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionssystem auf einem zeitaufgelösten FRET-System mit Lanthanidchelaten, vorzugsweise Europiumchelaten, beruht.
17. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß als weitere Hilfsmittel Pufferlösungen, Stabilisatoren und / oder Energieäquivalente eingesetzt werden.
18. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine zu untersuchende Verbindung und mindestens eine Zusammensetzung enthaltend cNPK und ATP, und mindestens ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des phosphorylierten cNPK Substrats zusammengestellt werden.
19. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine zu untersuchende Verbindung, mindestens eine Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase und mindestens ein geeignetes Detektionssystem zur quantitativen Bestimmung der Menge des dephosphorylierten VASP-Phosphatase-Substrats zusammengestellt werden.
20. HTS-geeignetes Verfahren zum Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Verbindungen, die die Aktivität der cNPK modulieren, umfassend die Schritte
 - i) In-Kontakt-Bringen der zu untersuchenden Verbindung oder einer Vielzahl von zu untersuchenden Verbindungen mit cNPK, ATP und geeignetem cNPK-Substrat, und
 - j) Quantifizierung des phosphorylierten cNPK-Substrats mit einem geeigneten Detektionssystem.

21. HTS-geeignetes Verfahren zum Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Verbindungen, die die Aktivität der VASP-Phosphatase modulieren, umfassend die Schritte:

- k) In-Kontakt-Bringen der zu untersuchenden Verbindung oder einer Vielzahl von zu untersuchenden Verbindungen mit VASP-Phosphatase und geeignetem VASP-Phosphatase-Substrat, und
- l) Quantifizierung des dephosphorylierten VASP-Phosphatase-Substrats mit einem geeigneten Detektionssystem.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Verbindung ausgewählt ist aus einer natürlich vorkommenden, natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten und/oder synthetischen Verbindung.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Verbindung in Form einer kombinatorischen Substanzbibliothek eingesetzt wird.

24. Verfahren zur Diagnose durch direkte und Gelelektrophorese-unabhängige Bestimmung der cNPK-Aktivität aus Proben umfassend die Schritte:

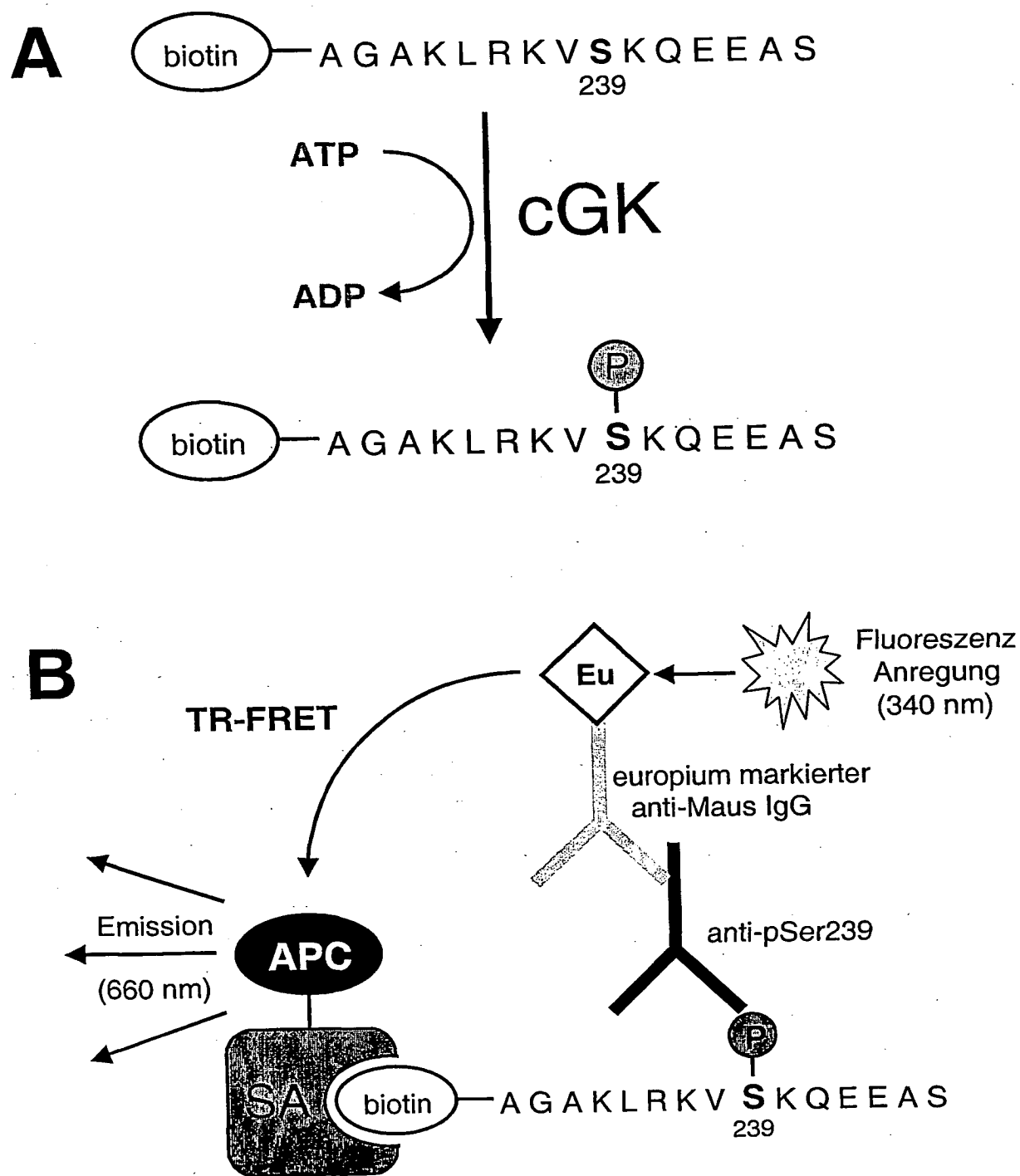
- m) Inkubieren einer Probe in Gegenwart mindestens einer Zusammensetzung enthaltend geeignetes cNPKS und ATP,
- n) Versetzen der Zusammensetzung mit mindestens einem geeigneten Detektionssystem zur Quantifizierung der Phosphorylierung des cNPKS; und
- o) Bestimmung der Aktivität der cNPK, insbesondere in Blut-/Zell- oder Gewebe-Extrakten oder in Form von permeabilisierten und/oder intakten Zellen.

25. Verfahren zur Diagnose durch direkte und Gelelektrophorese-unabhängige Bestimmung der VASP-Phosphatase-Aktivität aus Proben umfassend die Schritte:

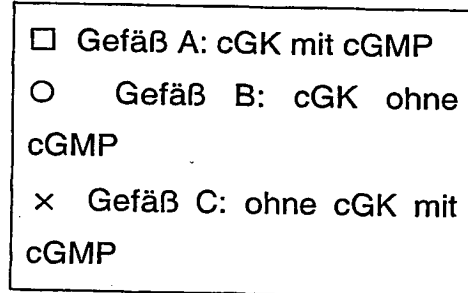
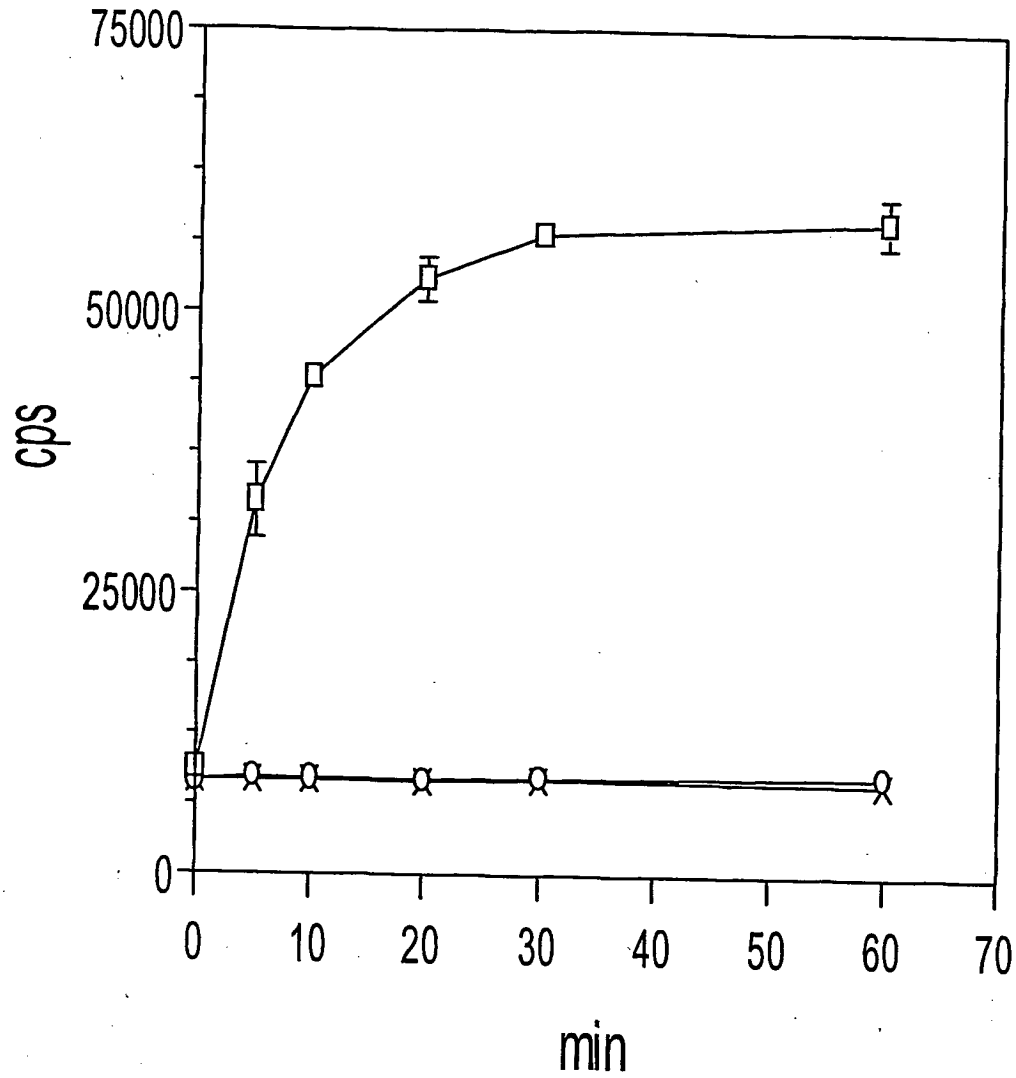
- p) Inkubieren einer Probe in Gegenwart mindestens einer Zusammensetzung enthaltend geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat
- q) Versetzen der Zusammensetzung mit mindestens einem geeigneten Detektionssystem zur Quantifizierung der Dephosphorylierung des VASP-Phosphatase-Substrats; und

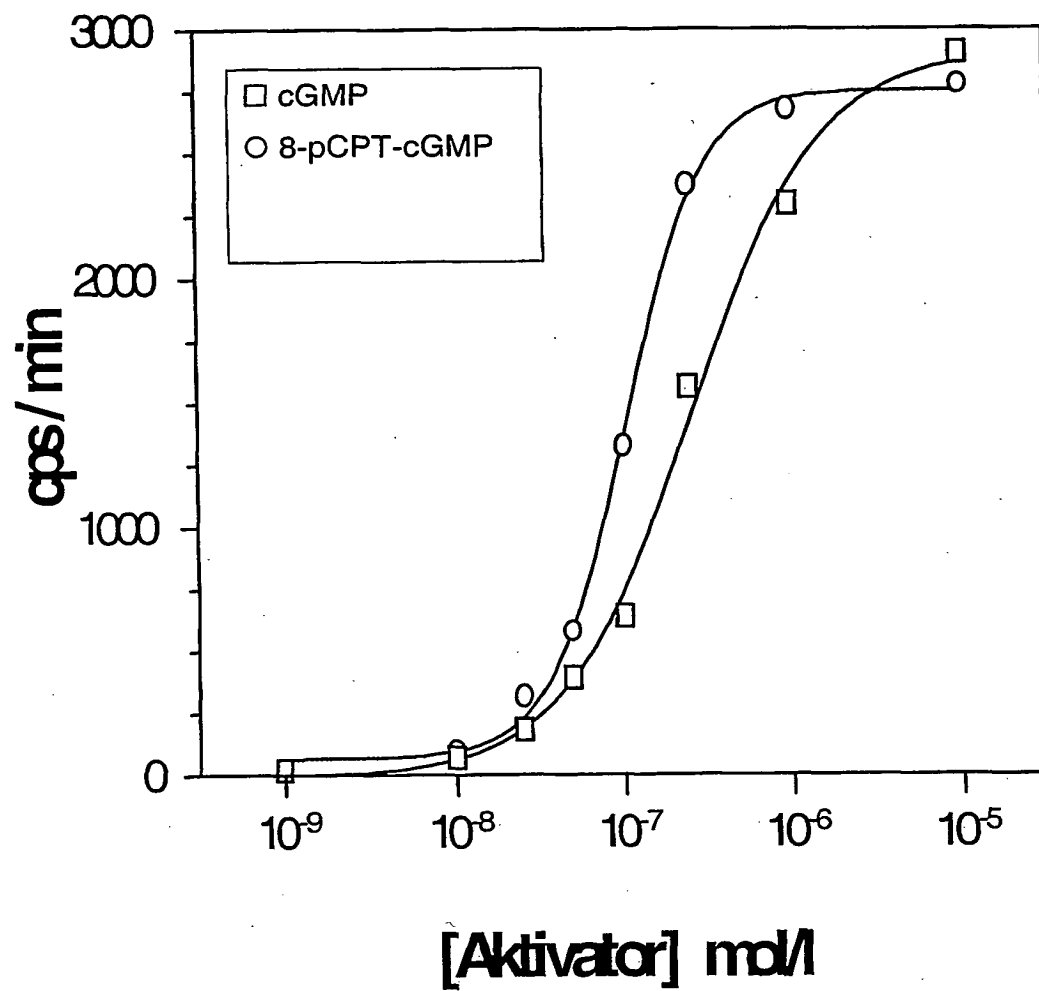
- r) Bestimmung der Aktivität der VASP-Phosphatase, insbesondere in Blut-/Zell- oder Gewebe-Extrakten oder in Form von permeabilisierten und/oder intakten Zellen.

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die Diagnose einer Erkrankung handelt, die ausgewählt ist aus dem Spektrum der Herz-Kreislaufkrankungen und Krankheiten mit assoziierten Gefäßschäden, insbesondere Hypertonie, Thrombose, und dem Syndrom der endothelialen Dysfunktion bei Arteriosklerose, Diabetes und Vaskulitiden, oder Erkrankungen hämatopoetischer Zellen, wie akute Leukämie, myeloproliferative Erkrankungen oder Myelodysplasien.



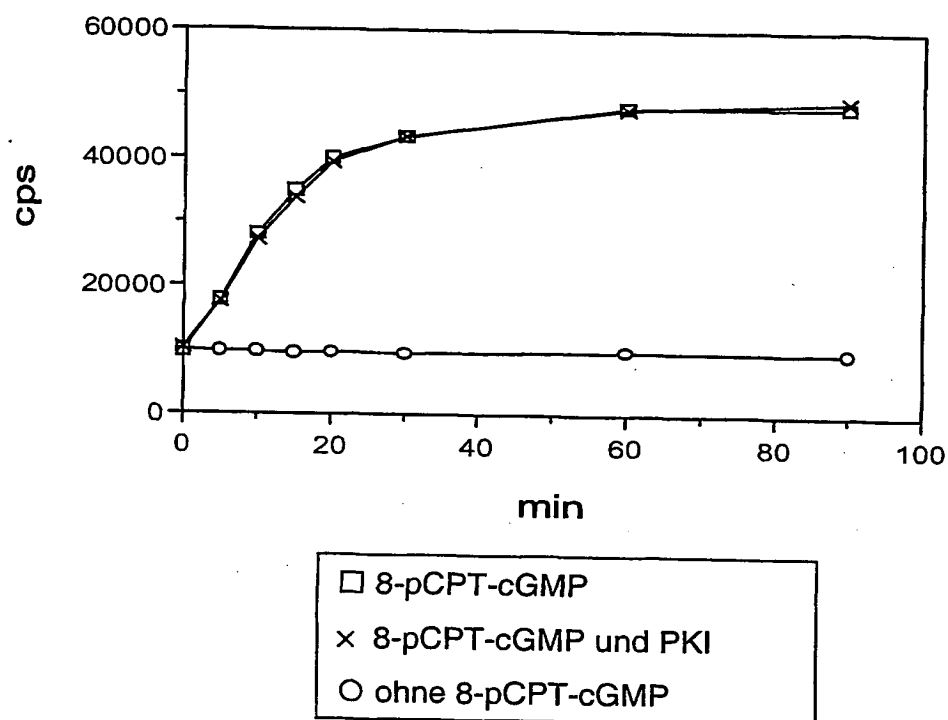
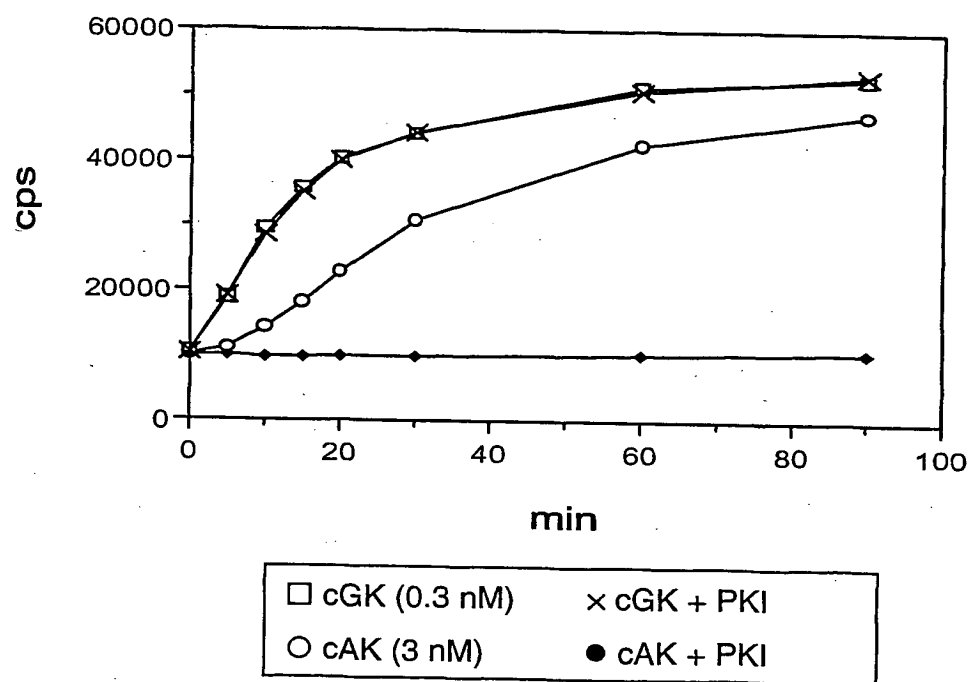
Figur 1

**Figur 2**



Figur 3

4/4

A**B****Figur 4**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Vasopharm Biotech GmbH

<120> Testsystem zur Bestimmung der Aktivität von
cyclo-Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen und
VASP-Phosphatasen

<130> 200va01.wo

<140>

<141>

<150> 10029210.0

<151> 2000-06-14

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Haffner, C.

Jarchau, T.

Reinhard, M.

Hoppe, J.

Lohmann, S.M.

Walter, U.

<302> Molecular cloning, structural analysis and functional
expression of the proline-rich focal adhesion and
microfilament-associated protein VASP

<303> EMBO J.

<304> 1995

<305> 14(1)

<306> 19-27

<313> 1 - 380

<400> 1

Met Ser Glu Thr Val Ile Cys Ser Ser Arg Ala Thr Val Met Leu Tyr
1 5 10 15

Asp Asp Gly Asn Lys Arg Trp Leu Pro Ala Gly Thr Gly Pro Gln Ala
20 25 30

Phe Ser Arg Val Gln Ile Tyr His Asn Pro Thr Ala Asn Ser Phe Arg
35 40 45

Val Val Gly Arg Lys Met Gln Pro Asp Gln Gln Val Val Ile Asn Cys
50 55 60

Ala Ile Val Arg Gly Val Lys Tyr Asn Gln Ala Thr Pro Asn Phe His
65 70 75 80

Gln Trp Arg Asp Ala Arg Gln Val Trp Gly Leu Asn Phe Gly Ser Lys
85 90 95

Glu Asp Ala Ala Gln Phe Ala Ala Gly Met Ala Ser Ala Leu Glu Ala
100 105 110

Leu Glu Gly Gly Gly Pro Pro Pro Pro Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ser
 115 120 125
 Val Pro Asn Gly Pro Ser Pro Glu Glu Val Glu Gln Gln Lys Arg Gln
 130 135 140
 Gln Pro Gly Pro Ser Glu His Ile Glu Arg Arg Val Ser Asn Ala Gly
 145 150 155 160
 Gly Pro Pro Ala Pro Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro
 165 170 175
 Pro Pro Pro Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Pro Pro Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Ala Ala Ala His Gly Ala Gly Gly Gly Pro Pro Pro Ala Pro
 195 200 205
 Pro Leu Pro Ala Ala Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro
 210 215 220
 Gly Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Lys Val Ser Lys
 225 230 235 240
 Gln Glu Glu Ala Ser Gly Gly Pro Thr Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly
 245 250 255
 Arg Ser Gly Gly Gly Gly Leu Met Glu Glu Met Asn Ala Met Leu Ala
 260 265 270
 Arg Arg Arg Lys Ala Thr Gln Val Gly Glu Lys Thr Pro Lys Asp Glu
 275 280 285
 Ser Ala Asn Gln Glu Glu Pro Glu Ala Arg Val Pro Ala Gln Ser Glu
 290 295 300
 Ser Val Arg Arg Pro Trp Glu Lys Asn Ser Thr Thr Leu Pro Arg Met
 305 310 315 320
 Lys Ser Ser Ser Ser Val Thr Thr Ser Glu Thr Gln Pro Cys Thr Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ser Asp Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu Leu
 340 345 350
 Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile Glu
 355 360 365
 Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Lys Arg Gly Ser Pro
 370 375 380

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/96594 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/48, I/42, G01N 33/573

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): VASOPHARM BIOTECH GMBH [DE/DE]; Sedanstrasse 27, 97082 Würzburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06621

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juni 2001 (12.06.2001)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DRÜCKES, Peter [DE/DE]; Hummelstrasse 11, 79100 Freiburg (DE). JAR-CHAU, Thomas [DE/DE]; St.-Rochus-Strasse 66, 97078 Würzburg (DE). WALTER, Ulrich [DE/DE]; Leichtacker Strasse 6, 97209 Veitshöchheim (DE). BADER, Benjamin [DE/DE]; Schillerstrasse 41, 13158 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

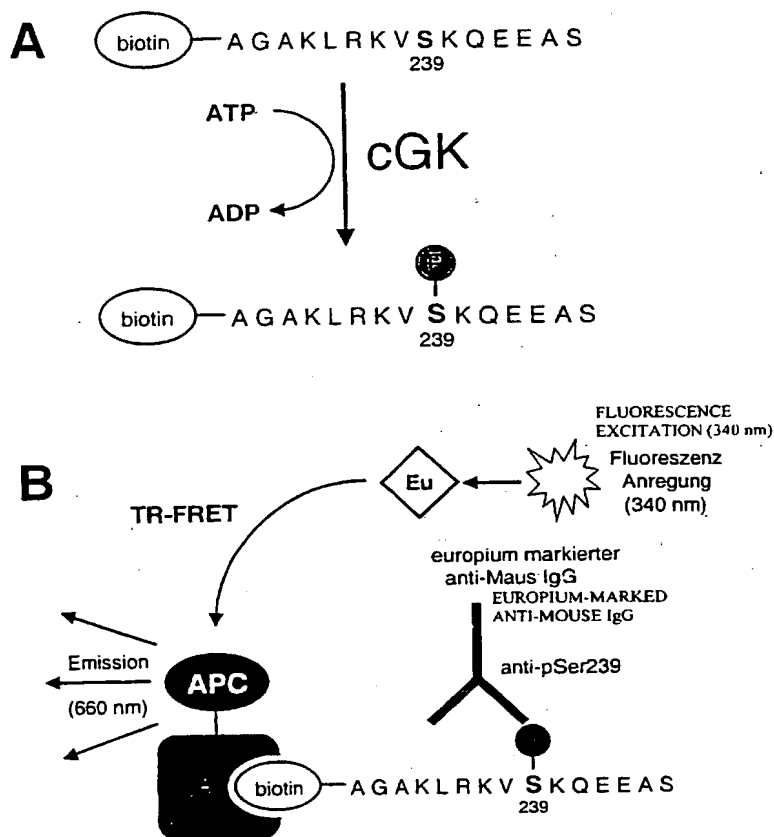
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 29 210.0 14. Juni 2000 (14.06.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TEST SYSTEM FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF CYCLO-NUCLEOTIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASES AND VASP PHOSPHATASES

(54) Bezeichnung: TESTSYSTEM ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON CYCLO-NUKLEOTID-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN UND VASP-PHOSPHATASEN



(57) Abstract: The invention relates to an HTS-appropriate test system for detecting the activity of cyclonucleotide-dependent protein kinases (cNPK) containing: a) at least one test compound; b) at least one appropriate cNPK substrate; c) at least one composition, which is to be incubated and which contains cNPK and ATP, optionally, phosphorylation reaction stoppers, and; d) an appropriate detection system for quantifying the phosphorylation of the cNPK substrate. The invention also relates to an HTS-appropriate test system for detecting the activity of VASP phosphatases containing: e) at least one test compound; f) at least one appropriate VASP phosphatase substrate; g) at least one composition, which is to be incubated and which contains VASP phosphatase, and; h) an appropriate detection system for quantifying the dephosphorylation of the VASP phosphatase substrate. The described test systems can be used for locating compounds, which modulate the activity of a cNPK or of a VASP phosphatase, from chemical or natural substance libraries.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(74) **Anwalt:** VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;
Postfach 22 14 43, 80504 München (DE).

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

16. Mai 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität von cyclo-Nucleotid-abhängigen Proteinkinasen (cNPK) enthaltend a) mindestens eine Testverbindung, b) mindestens ein geeignetes cNPK-Substrat, c) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend cNPK und ATP, ggf. Phosphorylierungsreaktionsstopper, und d) ein geeignetes Detektionssystem zur Quantifizierung der Phosphorylierung des cNPK-Substrats. Ferner wird ein HTS-geeignetes Testsystem zum Nachweis der Aktivität von VASP-Phosphatasen beschrieben enthaltend e) mindestens eine Testverbindung, f) mindestens ein geeignetes VASP-Phosphatase-Substrat, g) mindestens eine zu inkubierende Zusammensetzung enthaltend VASP-Phosphatase, und h) ein geeignetes Detektionssystem zur Quantifizierung der Dephosphorylierung des VASP-Phosphatase-Substrats. Die beschriebenen Testsysteme lassen sich zum Auffinden von Verbindungen, die die Aktivität einer cNPK oder einer VASP-Phosphatase modulieren, aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken einsetzen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/06621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12Q1/48 C12Q1/42 G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	DOSTMANN WOLFGANG R G ET AL: "Delineation of selective cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha substrate and inhibitor peptides based on combinatorial peptide libraries on paper." PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 82, no. 2-3, May 1999 (1999-05), pages 373-387, XP001066204 ISSN: 0163-7258 cited in the application the whole document	1-26
Y	WO 99 09199 A (RYAZANOV ALEXEY G ;UNIV NEW JERSEY MED (US); PAVUR KAREN S (US); H) 25 February 1999 (1999-02-25) abstract claim 27	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2002

Date of mailing of the international search report

19/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/06621

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 24473 A (HOSCHUETZKY HEINZ ;WALTER ULRICH (DE); EIGENTHALER MARTIN (DE); HO) 20 May 1999 (1999-05-20) cited in the application abstract page 2, line 28 -page 6, line 19 ---	1-26
X	JARCHAU T ET AL: "Purification and assays of vasodilator - stimulated phosphoprotein" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 298, 1998, pages 103-113, XP002097408 ISSN: 0076-6879 page 109, paragraph 2 -page 111, paragraph 2 ---	24-26
X	SMOLENSKI ET AL: "Analysis and regulation of vasodilator - stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 32, 7 August 1998 (1998-08-07), pages 20029-20035, XP002097407 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	24-26
X	BUTT ET AL: "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites o the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 269, no. 20, 20 May 1994 (1994-05-20), pages 14509-14517, XP002097404 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	24-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/06621

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ABEL ET AL: "Monoclonal antibodies against the focal adhesion protein VASP revealing epitopes involved in the interaction with two VASP binding proteins and VASP phosphorylation" EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT, STUTTGART,, DE, vol. 69, 1996, page 39 XP002097463 ISSN: 0171-9335 abstract</p> <p>-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/06621

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9909199	A	25-02-1999	US 6346406 B1	12-02-2002
			AU 9110098 A	08-03-1999
			EP 1060260 A2	20-12-2000
			WO 9909199 A2	25-02-1999
WO 9924473	A	20-05-1999	DE 19749091 C1	29-07-1999
			AU 1871299 A	31-05-1999
			BR 9813988 A	26-09-2000
			CN 1279691 T	10-01-2001
			WO 9924473 A1	20-05-1999
			EP 1042368 A1	11-10-2000
			HU 0004099 A2	28-03-2001
			JP 2001522865 T	20-11-2001
			PL 340465 A1	12-02-2001
			TR 200001265 T2	21-09-2000

PCT/EP 01/06621

IPK 7 C12Q1/48 C12Q1/42 G01N33/573

IPK 7 C120 GOIN

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

Betr. Anspruch Nr.

1-26

1-26

— / —

X Siehe Anhang Patentfamilie

* T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist.

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

***Y** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

8 Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/03/2002

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 24473 A (HOSCHUETZKY HEINZ ;WALTER ULRICH (DE); EIGENTHALER MARTIN (DE); HO) 20. Mai 1999 (1999-05-20) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2, Zeile 28 -Seite 6, Zeile 19 ---	1-26
X	JARCHAU T ET AL: "Purification and assays of vasodilator - stimulated phosphoprotein" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 298, 1998, Seiten 103-113, XP002097408 ISSN: 0076-6879 Seite 109, Absatz 2 -Seite 111, Absatz 2 ---	24-26
X	SMOLENSKI ET AL: "Analysis and regulation of vasodilator - stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 273, Nr. 32, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 20029-20035, XP002097407 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	24-26
X	BUTT ET AL: "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites o the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 269, Nr. 20, 20. Mai 1994 (1994-05-20), Seiten 14509-14517, XP002097404 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	24-26
A	ABEL ET AL: "Monoclonal antibodies against the focal adhesion protein VASP revealing epitopes involved in the interaction with two VASP binding proteins and VASP phosphorylation" EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT, STUTTGART,, DE, Bd. 69, 1996, Seite 39 XP002097463 ISSN: 0171-9335 Zusammenfassung -----	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/06621

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9909199 A	25-02-1999	US 6346406 B1	12-02-2002
		AU 9110098 A	08-03-1999
		EP 1060260 A2	20-12-2000
		WO 9909199 A2	25-02-1999
WO 9924473 A	20-05-1999	DE 19749091 C1	29-07-1999
		AU 1871299 A	31-05-1999
		BR 9813988 A	26-09-2000
		CN 1279691 T	10-01-2001
		WO 9924473 A1	20-05-1999
		EP 1042368 A1	11-10-2000
		HU 0004099 A2	28-03-2001
		JP 2001522865 T	20-11-2001
		PL 340465 A1	12-02-2001
		TR 200001265 T2	21-09-2000

